

Telaah Pustaka Ciri dan Metode-metode Identifikasi Kuman *Mycobacteria Tuberculosis*

Novrido Charibaldi^{*1}, Agus Harjoko²

¹ Jurusan Teknik Informatika, FTI, UPN "Veteran" Yogyakarta

² Laboratorium Elektronika Instrumentasi, FMIPA, UGM, Yogyakarta

e-mail: ^{*1}novrido@gmail.com, ²aharjoko@ugm.ac.id

Abstrak

Tuberculosis (TB) merupakan penyakit paling berbahaya ketiga yang menyebabkan kematian yang disebabkan kuman Mycobacteria Tuberculosis (MTB). Sejak 1992 WHO telah mencanangkan TB sebagai Global Emergency. WHO melaporkan 8-9 juta orang tertular setiap tahun. Sejak tahun 2004 angka kematian yang disebabkan TB rata-rata 8000 setiap hari dan 2-3 juta setiap tahun. Identifikasi kuman MTB adalah permasalahan yang solusinya melibatkan berbagai cabang ilmu pengetahuan (ilmu penyakit dalam, biologi molekuler patogen, mikrobiologi klinis, teknik kimia, bioinformatika dan teknik biomedis, matematika, dan sistem cerdas dalam ilmu komputer dan elektronika). Penularan kuman MTB sangat cepat tersebar melalui udara yang membawa partikel-partikel dalam 3000 percikan dahak penderita TB saat mereka batuk atau bersin kemudian terhisap orang yang sehat, sehingga identifikasi yang cepat dan tepat terhadap bakteri ini sangat berguna untuk menghambat penyebarannya. Ada banyak identifier kuman MTB yang dapat digunakan yaitu warna koloni biakan (2-8 minggu), foto torax, struktur molekul, kode DNA, dan chromatogram dari biomarker. Ada banyak pula pendekatan untuk mengidentifikasi MTB yaitu microscopy, analisa foto sinar-x, analisa kimia, analisa biologi molekuler, analisa genetika, dan proses kromatografi gas/cair dengan dukungan hidung elektronik dan komputer. Dalam paper ini telah dibahas berbagai ciri dan pendekatan yang telah dikembangkan untuk mengidentifikasi kehadiran kuman MTB dalam biakan, hembusan nafas dan/atau dahak pasien.

Kata kunci—MTB, chromatogram, biomarker, hidung elektronik, sistem cerdas.

Abstract

Tuberculosis (TB) is the third most dangerous disease that causes deaths that caused by Mycobacteria Tuberculosis (MTB). Since 1992 WHO has declared TB a Global Emergency. WHO reported 8-9 million people are infected every year. Since 2004 the death rate that caused TB is 8000 per day and 2-3 millions per year. Identification of MTB germ is a problem whose solution involves various branches of science (the science of lung disease, pathogen molecular biology, clinical microbiology, chemical engineering, bioinformatics and biomedical engineering, mathematics, and intelligent systems in computer science and electronics). MTB germ infection is very fast because they are spread through the air that carrying the particles in 3000 sparks of TB patients' sputum when they are coughing or sneezing and then inhaled by a healthy person, so that speed and precise identification of these bacteria are very useful to inhibit its spread. There are many MTB germ identifiers that can be used, they are the color of breeding colonies (2-8 weeks), the torax image, the structure of molecules, the DNA code, and the chromatogram of biomarkers. There are many approaches for identification of MTB, they are microscopy, x-ray analysis, chemical analysis, analysis of molecular biology, genetic analysis, and process of gas/liquid chromatography that supported electronic noses and a computer. This paper discussed the various features and approaches that have been developed for identification of the presence of MTB germ in culture, blast of breath and/or patients' sputum.

Keywords—MTB, chromatogram, biomarkers, electronic nose, intelligent systems.

1. PENDAHULUAN

Ada banyak metode untuk mengidentifikasi species MTB dari seorang atau lebih pasien, generasi pertama dengan *microscopy* (dengan biakan, pewarnaan Ziehl-Neelsen (ZN), dan dengan visualisasi langsung di bawah *microscope* [1] dan [2], generasi kedua dengan teknik radiografi sinar-x torax [3] dan [4], dengan teknik amplifikasi asam nukleat [5], dan dengan *clinical suspicion of TB* (CSTB) [4], generasi ketiga dengan melihat struktur dan kecepatan molekul aroma nafas/dahak pasien [6], [7], dan [8], generasi keempat dengan teknologi *biosensing* [9], dengan analisa genetika dalam genome mycobacterial, untuk mengenal urutan *nucleotide* suatu species berdasarkan hybridisasi *DNA probe* serta urutan *geneticnya* [10] dan [11], dan dengan mengenal *biomarker* berupa senyawa organik yang mudah menguap (VOC).

Penelitian untuk menemukan *biomarker* yang paling tepat untuk digunakan mendeteksi kehadiran *MTB* masih menjadi topik banyak penelitian sejak belasan tahun terakhir sampai kini terus berlangsung. Ada beberapa *biomarker* yang telah dicoba beberapa peneliti untuk mendeteksi *feature/profile* dari aroma *MTB* pada nafas atau dahak pasien, atau biakan *MTB*, yaitu Asam *Mycolic* [12], [13], [14] dan [15], *Methyl Nicotinate* [16], Asam *Tuberculoistearic* (TBSA) dan Asam *Hexacosanoic* (HCA) [17], *Alkane* (misal *tridecane*), turunan *alkane* (misal *dodecane*), hasil tekanan oksidatif (misal *benzene*, *cyclohexane*, *decane*, *heptanes*) [4] dan *Ester Methyl Mycocate* [18].

2. METODE PENELITIAN

Aroma telah lama digunakan untuk mendiagnosa penyakit, misalnya digunakan oleh bangsa Yunani dan Cina sejak 2000 SM. Kini setelah kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, aroma masih dapat digunakan untuk mendiagnosa suatu penyakit. Berdasarkan biomolekuler, aroma dimiliki oleh molekul aroma suatu uap ataupun gas, secara umum molekul aroma memiliki empat karakteristik dasar yaitu terang, kutubnya polar, hidrofobik dan kecil (masa kurang lebih 300 Da), berdasarkan mikrobiologi klinis, suatu penyakit dapat diidentifikasi dari aroma suatu senyawa organik tertentu (*biomarker*). Dahak pasien TB terdapat banyak bakteri dan menimbulkan aroma yang kompleks dan sulit dipisahkan mana aroma yang berasal dari *MTB* dan mana yang berasal dari bakteri-bakteri lain [19].

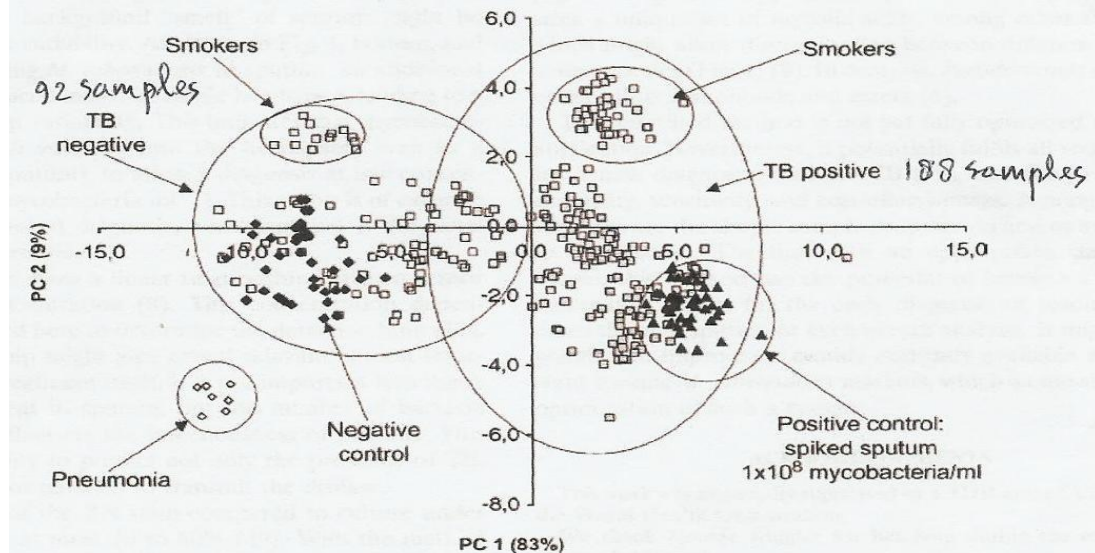
Ada beberapa metode yang menggunakan *biomarker* tersebut, pertama hanya dengan menggunakan *electronic nose* [1], [2], dan [20], kedua dengan metode *Gas-liquid chromatography* (GLC) [12] dan [13], ketiga dengan metode *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) [15], keempat dengan metode *Gas-Chromatography Mass-Spectrometry* (GC-MS) [14] atau dengan metode *Gas Chromatography/Mass Spectroscopy* (GC/MS) [16] dan [4], kelima dengan metode *Thermally Hydrolysis and Methylation* (THM) dan *Gas-Chromatography Mass-Spectrometry* (GC-MS) [17], keenam dengan mengkombinasikan metode *Gas Chromatography* (GC) dan *e-Nose* [21], dan ketujuh dengan metode *Thermochemolysis-gas chromatography-electron impact mass spectrometry* (THM-GC-EI/MS) [18].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Metode Yang Hanya Menggunakan eNose

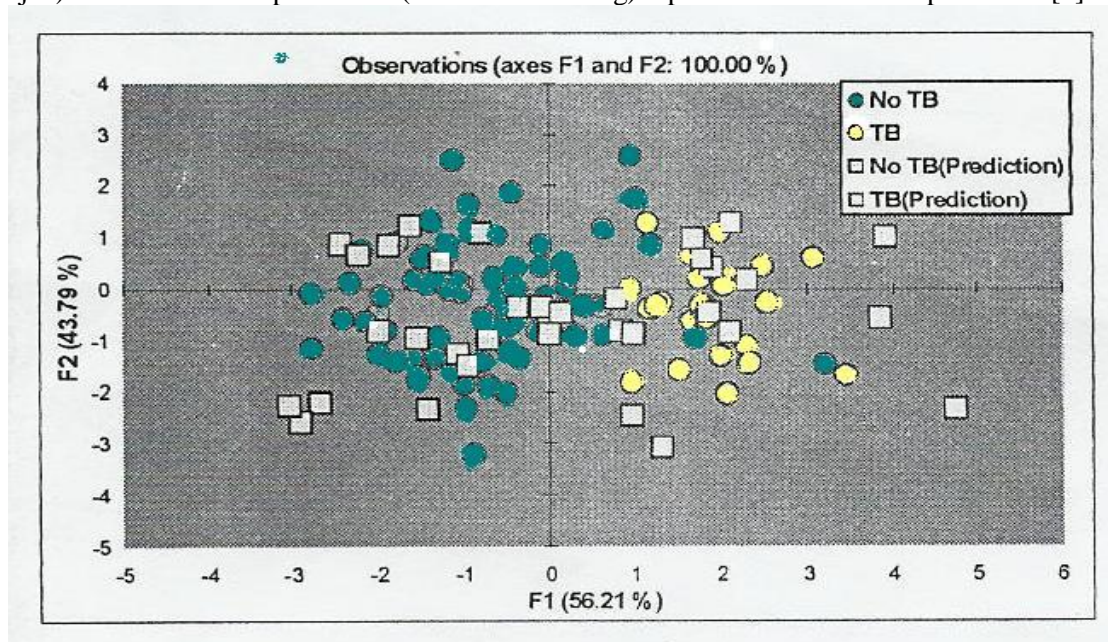
Fungsi utama dari sebuah *eNose* adalah menirukan sistem penciuman manusia dengan cara menggabungkan sensor gas nonspesifik dengan sistem pengenalan pola, sehingga sistem ini diharapkan mampu mengenal aroma yang kompleks tanpa memisahkan campuran menjadi komponen-komponen *species* [1]. *Feature* yang digunakan untuk mengidentifikasi *biomarker* dengan cara ini adalah kurva respon *eNose* yang dihasilkan dari molekul aroma uap dahak pasien. Penyerapan VOC yang diukur pada permukaan sensor menyebabkan perubahan fisik (konduktivitas, resistansi dan frekuensi) sensor. Karena kekhasan yang parsial dan *overlapping*, maka kurva respon dari setiap sensor dalam *eNose* dapat direkam selama pengukuran, dengan cara ini diharapkan mampu dibedakan sampel-sampel yang berbeda. Kurva respon tersebut

digambarkan dengan persamaan matematika yang dinyatakan dengan **tingkat penyerapan maksimum, laju desorpsi, respon maksimum** (atau **divergen**), dan **area di bawah kurva respon**. Persamaan-persamaan matematika itu kemudian dianalisis dengan perangkat lunak pengenalan pola. Meskipun demikian, belum terjadi pemisahan yang sempurna, seperti yang ditunjukkan oleh tanda positif TB dan tanda negatif TB yang *overlapping*, lihat Gambar 1 [1].



Gambar 1 Terjadi irisan daerah positif TB dan negatif TB [1]

Gambar 1 dan 2 memperlihatkan banyak terjadi infiltrasi sampel negatif TB (tanda bulat hijau) ke dalam daerah positif TB (tanda bulat kuning) diperlihatkan oleh hasil penelitian [2].



Gambar 2 Infiltrasi negatif TB ke daerah positif TB [2]

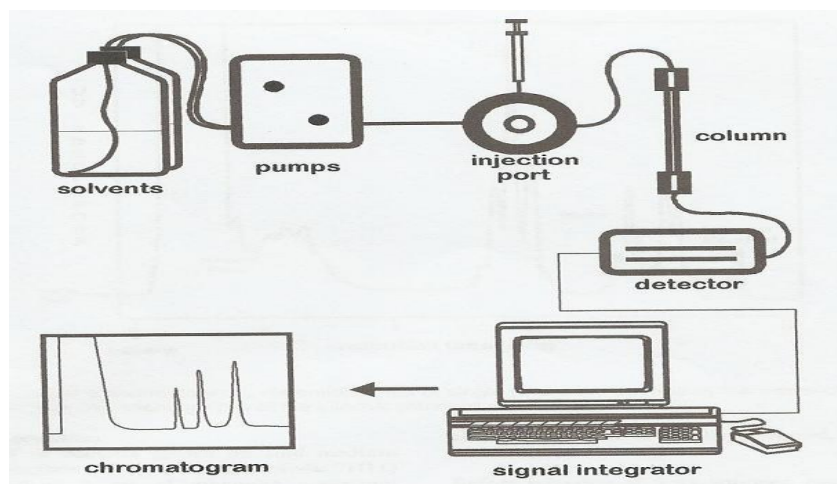
Deteksi TB yang menggunakan teknologi *eNose* menghasilkan kekhasan dan kepekaan antara 70-80% dari identifikasi bakteri MTB yang hidup [2].

3.2 Metode High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Atas dasar infiltrasi yang telah ditunjukkan Gambar 2 dan 3, maka **diperlukan cara untuk memisahkan sampel dahak yang menguap menjadi komponen-komponen yang lebih kecil dan kemudian setiap komponen tersebut diidentifikasi karakteristiknya**. Cara

tersebut adalah dengan kromatografi, molekul uap/gas sampel akan bergerak menuju kolom melalui *injection port* menuju fase diam, setelah diuapkan kembali kemudian molekul sampel akan digerakkan oleh fase gerak dan melewati kolom, molekul yang berikatan kuat dalam fase gerak akan bergerak lebih lambat sedangkan molekul yang berikatan lemah dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (perhatikan Gambar 6 dan 7). Waktu tempuh setiap molekul dalam kolom akan berbeda-beda sesuai dengan sifat kimianya. Jika kondisi kolom dipilih dan dipantau secara tepat maka komponen molekul sampel akan keluar kolom secara berurutan dan masuk ke detektor sesuai waktu retensinya [22].

Metode kromatografi cair yang dinamakan *high performance liquid chromatography* (HPLC) digunakan untuk mengidentifikasi biomarker asam *mycolic* dari dinding sel MTB diperkenalkan pada dekade terakhir ini, meskipun handal, metode ini belum digunakan dalam laboratorium mikrobiologi klinis. Berbagai kombinasi rantai panjang asam *mycolic* dari dinding sel *mycobacteria* (yang dihasilkan dengan metode-metode analisis yang berbeda) cocok menjadi objek dari analisis HPLC terhadap kromatogram yang dihasilkan. Perbandingan profil tersebut dengan salah satu species *mycobacteria* yang dikenal, **memungkinkan identifikasi sampai tingkat species**, tanpa perlu mengenali senyawa individu [15].



Gambar 3 Ilustrasi Sistem HPLC [15]

Berdasarkan konvensi, hanya puncak $\geq 2\%$ dari total semua tinggi puncak yang dihitung selama beberapa menit pertama. Setiap puncak yang valid diidentifikasi berdasarkan *relative retention time (RRT)* yang ditentukan oleh *internal standard (IS)* dan ditandai berdasarkan skema yang diusulkan *Center for Disease Control* seperti Gambar 4 [15].

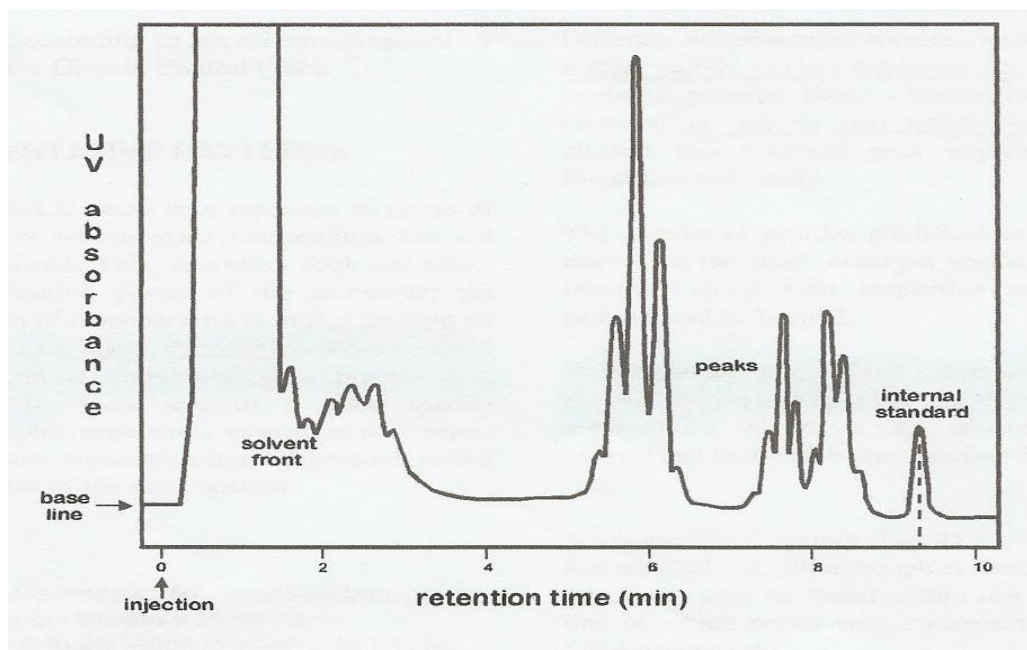
Puncak-puncak kromatogram individual menggambarkan campuran asam-asam *mycolic* yang memiliki komposisi tertentu, identifikasi *mycobacteria* layak berdasarkan **jumlah**, **posisi (RRT)** dan **tinggi relatif** dari puncak individu dalam kromatogram, ketiganya dapat menjadi parameter yang konsisten. Species *mycobacteria* yang berbeda menghasilkan profil komposisi puncak yang berbeda pula, dua pola utama yang digunakan yaitu puncak-puncak dalam cluster tunggal dan dalam dua cluster, sedangkan puncak yang lain jarang ditemukan [15].

Pengenalan profil adalah topik yang penting dalam identifikasi MTB berbasis HPLC mendorong pengembangan pohon keputusan, berdasarkan rasio tinggi puncak yang dipilih, sehingga microbiologist dapat langsung mengidentifikasi strain yang benar. Evolusi yang lebih canggih menggunakan algoritma pengenalan pola kromatogram yang dibantu komputer [15].

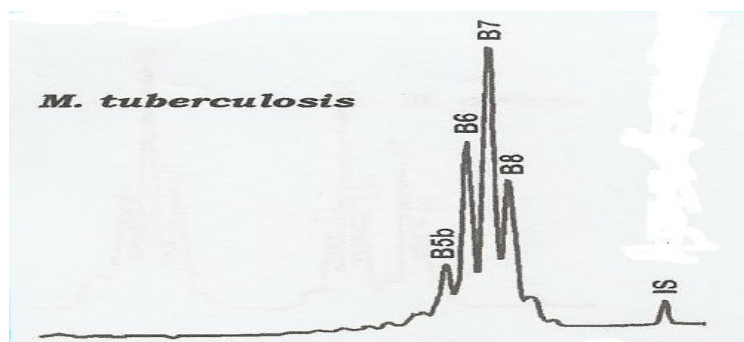
HPLC adalah metode yang cepat, karena keseluruhan prosedur dilakukan tidak lebih dari tiga jam, jauh lebih cepat dibandingkan prosedur konvensional yang membutuhkan waktu biakan berminggu-minggu. Konsistensi pola asam *mycolic* pada berbagai jenis *mycobacteria* dapat ditandai, hanya sedikit variasi yang berkaitan dengan usia biakan yang diuji.

Adanya biakan *mycobacteria* campuran adalah masalah utama pada hampir semua prosedur identifikasi. Adopsi terbaru dari sistem pemberian label untuk komposisi

puncak pada cluster-cluster dan suatu puncak standard diharapkan mengatasi kebingungan karakterisasi banyak profil yang muncul sebelumnya, perhatikan Tabel 1.



Gambar 4 Puncak-puncak dalam cluster diapit oleh *solvent front* dan *internal standar* (yang terjadi setelah 9.2 menit) [15]



Gambar 5 Puncak-puncak kromatogram MTB dalam cluster tunggal [15]

3.3. Metode Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (GC/MS)

Metode ini juga menggunakan *biomarker* VOC untuk mengidentifikasi kehadiran MTB dalam sampel nafas pasien positif TB. VOC yang digunakan adalah *methyl nicotinate* yang sebelumnya dilakukan derivatisasi (metilasi *in situ*) dengan 0.2 molar *Trimethyl sulfonium hydroxide* (TMSH) dari asam nikotinat [16].

Asam nikotinat sejak lama dikenal memainkan peran penting dalam reaksi reduksi oksidasi dalam metabolisme *mycobacteria* dan diproduksi dalam jumlah yang cukup sehingga dapat digunakan untuk membedakan MTB dari spesies *mycobacteria* lainnya [23], [24], dan [25]. Bahkan [26] telah meneliti kadar asam nikotinat pada penderita TB, ditemukan bahwa total kadar asam nikotinat pasien TB lebih tinggi dibandingkan orang normal. Namun, **asam nikotinat sangat polar dan kurang stabil** sehingga *nicotinate* dalam bentuk asam tidak dapat digunakan untuk mendeteksi TB dalam nafas, dengan metilasi *in situ* dihasilkan *methyl nicotinate* dari asam nikotinat, **dalam sampel nafas pasien positif TB yang dianalisis terbukti lebih banyak mengandung *methyl nicotinate* dibandingkan dengan nafas orang sehat yang tidak merokok** [16], perhatikan Gambar 8.

Tabel 1 Identifikasi Puncak Tunggal yang diberi Label Nama yang sesuai dengan RRT

Nama Puncak	<i>Relative Retention Time (range)</i>	Nama <i>Species</i> /Keterangan
F1	0.438-0.459	
F2	0.475-0.496	<i>Overlap</i> dengan F3
F3	0.495-0.515	<i>Overlap</i> dengan F2 dan F4
F4	0.512-0.532	<i>Overlap</i> dengan F3
A1	0.532-0.551	
A4	0.566-0.585	
A5	0.594-0.612	
M1	0.620-0.638	
M2	0.640-0.657	
M3	0.674-0.691	
M4	0.694-0.710	
M5	0.702-0.718	
M6	0.724-0.740	
B1	0.749-0.755	
B2	0.760-0.775	
B3	0.783-0.797	
B4	0.801-0.815	
B5a	0.816-0.830	
B5b	0.832-0.845	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
B6	0.844-0.857	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
B7	0.862-0.875	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
B8	0.878-0.891	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
B9	0.895-0.907	
E1	0.912-0.924	
E2	0.927-0.939	

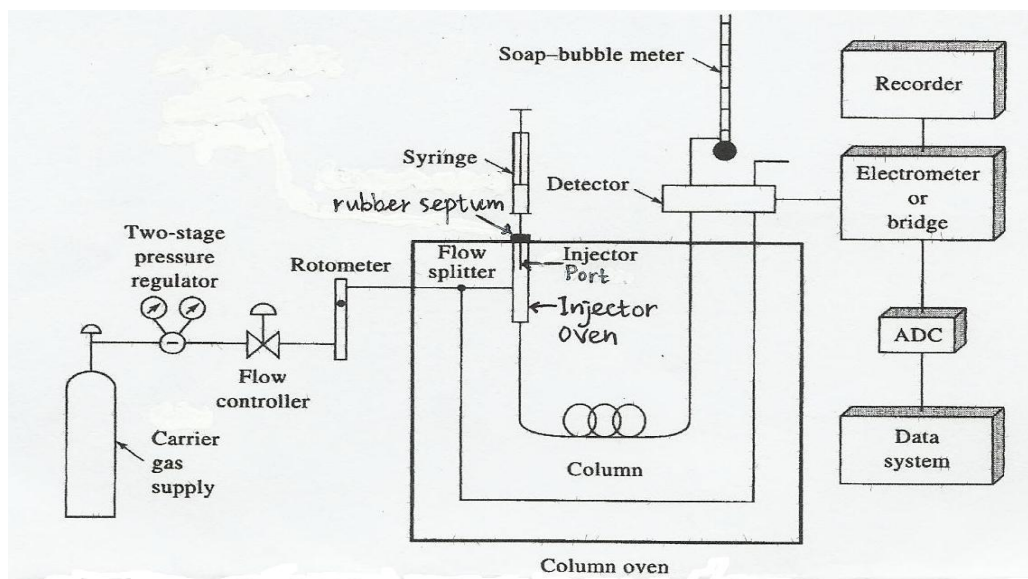
Hasil ini menunjukkan bahwa metode ini cukup kuat dan diskriminatif untuk menjamin studi lebih lanjut, sayangnya konsentrasi *methyl nicotinate* yang ditemukan masih rendah dalam nafas pasien penderita TB, secara teknis menantang untuk diteliti dan belum banyak yang dicapai ilmu pengetahuan, masih ditunggu apakah *eNose* dapat mendeteksi *methyl nicotinate* dalam jumlah yang sedikit [16].

3.4 Metode Thermally Hydrolysis and Methylation (THM) dan Gas-Chromatography Mass-Spectrometry (GC-MS)

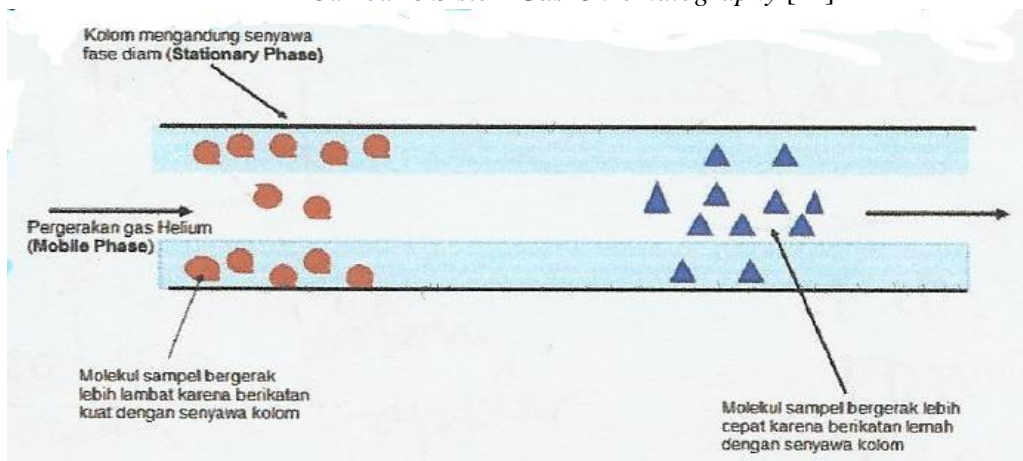
Metode Gas Chromatography (GC), cepat, mudah digunakan, dan tidak mahal, sudah mulai digunakan sejak tahun 1970-an untuk identifikasi *mycobacteria* [27]. Sayangnya, penggunaan GC memiliki kelemahan yaitu kebutuhan persiapan sampel yang kompleks sebelum analisis GC sebenarnya, untuk mengatasinya [23] menggunakan *solid phase micro extraction* (SPME) untuk membantu deteksi *biomarker* volatil spesies MTB.

Metode untuk mempersiapkan sampel dahak yang *non-treated* berdasarkan *stir-bar sorptive extraction* (SBSE) dan desorpsi termal, dikembangkan [28]. Kemudian [29] mengurangi sampel *pre-treatment* dengan mengembangkan SPME dari asam lemak pada bahan tersebut.

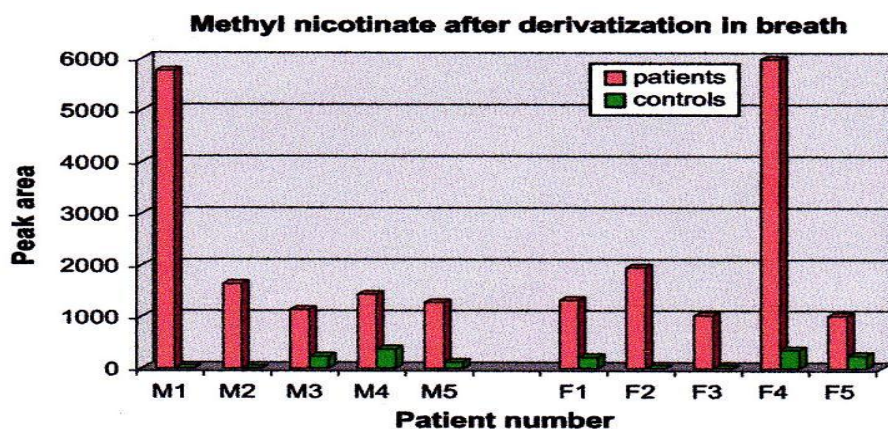
Metode lain yang diharapkan dapat mengurangi persiapan sampel, yaitu dengan menggunakan *hydrolysis and methylation* (THM) dengan kuantifikasi GC-MS *biomarker* MTB tertentu. THM konvensional menggunakan *tetramethyl ammonium hydroxide* (TMAH) untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan profil asam lemak [30]. THM untuk analisa polimer telah dipublikasi [17].



Gambar 6 Sistem Gas-Chromatography [22]



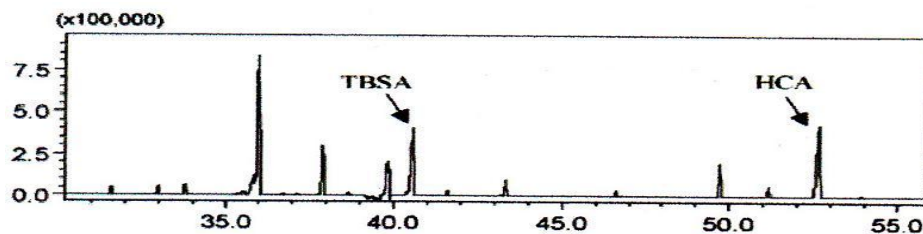
Gambar 7 Pemisahan Molekul Uap Dahak Pasien di dalam Kolom GC [22]

Gambar 8 Kadar *Methyl nicotinate* (setelah derivatisasi) pada pasien positif TB dibandingkan kontrol (orang yang sehat) dengan M=male dan F=female [23]

Metode persiapan sampel telah diubah menjadi metode otomatis (THM) yang tidak lagi memerlukan robot [17] pertukaran sampel yang kompleks [31] dan [32]. Prosedur THM dilakukan di dalam injektor *programmed temperature vaporizing* (PTV) yang semua

penanganan sampelnya dilakukan dengan *standard robotic GC auto sampler*. Dengan menggunakan pendekatan baru itu, maka polimer, dahak, atau biakan bakteri dapat disuntikkan tanpa atau dengan persiapan sampel yang minimal. Ini bisa menghilangkan kelemahan utama penggunaan GC untuk diagnosa TB.

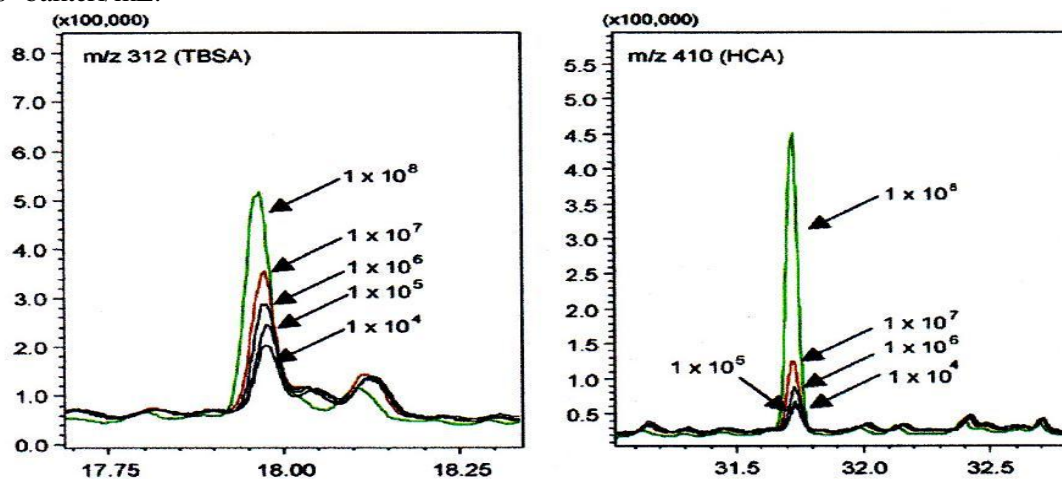
Berikut prosedur THM-GC-MS oleh [17] telah dioptimasi untuk injeksi sampel dahak, *Tuberculostearic acid* (TBSA) dan *Hexacosanoic* (HCA) digunakan sebagai *biomarker* untuk mengidentifikasi MTB.



Gambar 9 THM-GC-MS Chromatogram (ion yang diseleksi m/z 74) sampel setelah substraksi medium, muncul TBSA yang dimetilasi (R_t 40.5 menit) dan HCA (R_t 52.6 menit) [17]

Gambar 9 menunjukkan *chromatogram* yang disubstraksi dari sampel biakan MTB dimana TBSA dimetilasi dan HCA dideteksi. HCA dikenal sebagai produk turunan asam *Mycolic*, pada komponen dinding sel dari *Mycobacteria*. Asam *Mycolic* ini dihasilkan pada saat/setelah pemanasan untuk membentuk *aldehyde* dan asam, sehingga asam *Hexacosanoic* MTB terbentuk [33].

Gambar 10 menunjukkan kromatogram *selected ion-monitoring* (SIM) yang diperoleh dari sampel dahak yang dicemari untuk dilihat kadar TBSA yang dimetilasi dan kadar HCA. Untuk TBSA, ditemukan hubungan antara jumlah bakteri yang dicemarkan dan daerah puncak fragmen. Sayangnya, korelasi ini tidak linier. Untuk HCA, terutama untuk konsentrasi yang lebih rendah (di bawah 1×10^5 bakteri/mL) tidak ada relasi linier yang ditemukan antara tingkat pencemaran dan daerah puncak. Efek ini disebabkan oleh rendahnya kadar HCA yang ada di kedua sampel dahak. Berdasarkan TBSA, batas deteksi dari metode tersebut lebih baik dari 1×10^4 bakteri/mL.

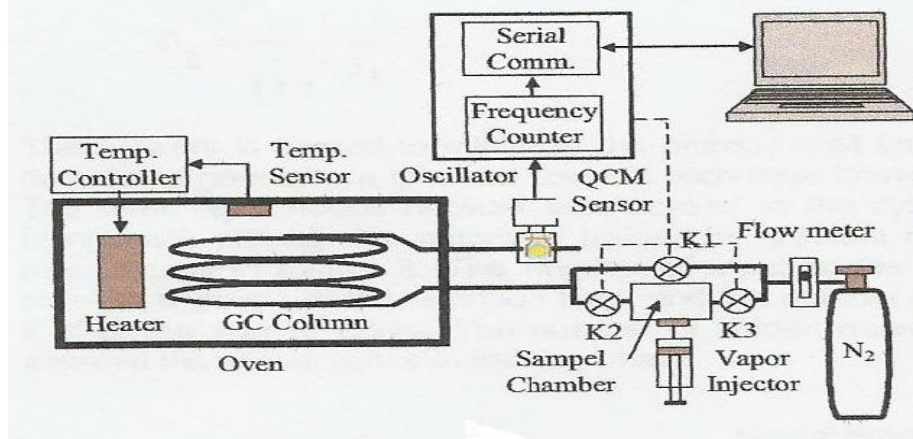


Gambar 10 Kromatogram SIM yang diperoleh dari sampel dahak yang dicemari 1×10^4 sampai 1×10^8 bakteri/mL [17]

3.5 Metode Gas Chromatography (GC) dan e-Nose jenis Quartz Crystal Microbalance

Cara ini mengkombinasikan metode *gas chromatography* (GC) dan hidung elektronik jenis *quartz crystal microbalance* (QCM). Sistem ini terdiri atas kolom GC dan array sensor QCM 10-MHz yang menghasilkan pola yang khas setiap aroma dalam ranah waktu, perhatikan Gambar 11. Beberapa aroma senyawa organik digunakan untuk mengevaluasi selektivitas

sistem tersebut. Sistem ini dapat membedakan pelarut organik senyawa yang berbeda kelas (misalnya senyawa aromatik dengan alkohol), dan dapat pula membedakan senyawa dalam kelas yang sama (misalnya premium dengan pertamax). Jaringan syaraf tiruan dapat dilatih untuk mengenali jenis aroma yang diujikan dalam taraf identifikasi 85%, sistem ini dapat menggantikan hidung manusia terutama untuk mengenali aroma senyawa yang beracun [21].



Gambar 11 Sistem kombinasi GC Column dan e-nose Quartz Crystal Microbalance [21]

3.6 Metode Thermochemolysis-gas chromatography-electron impact mass spectrometry (THM-GC-EI/MS)

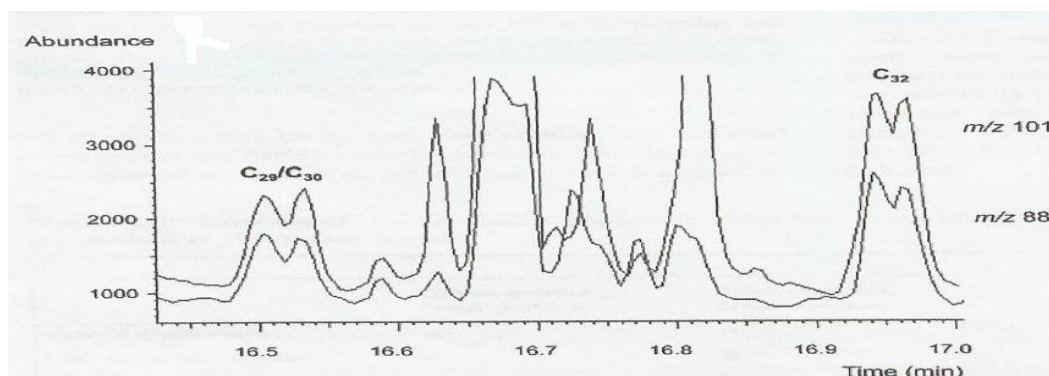
Metode ini diawali dengan deteksi gugus lemak yang merupakan komponen penting dalam dinding sel MTB. Analisis kimia memiliki keuntungan dibandingkan metode biakan, karena lebih cepat dan tidak memerlukan organisme hidup. Ester methyl asam mycocerosic dari family *phthiocerol dimycocerosate* (PDIM) pada lemak kompleks dinding sel ditentukan sebagai biomarker diagnosa Tuberculosis [18]. Anggota *Mycobacterium Tuberculosis* yang kompleks ini memiliki profil karakteristik terdiri atas asam trimethyl C₂₉, asam tetramethyl C₃₀ dan C₃₂. Asam lemak jenis ini ditemukan di MTB dan spesies lainnya. PDIMs dari *Mycobacterium Tuberculosis* ini adalah paraffin yang sangat stabil, tersusun atas campuran dari rantai panjang asam mycocerosic multimethyl-branched yang teresterifikasi menjadi diol rantai panjang C₃₄ dan C₃₆, *phthiocerols*. Keuntungan lemak PDIM dibanding lemak lainnya adalah polaritasnya yang sangat rendah dan istimewa diekstraksi dengan pelarut non-polar [18].

Thermochemolysis-gas chromatography-electron impact mass spectrometry (THM-GC-EI/MS) dari lilin PDIM standar menghasilkan karakteristik ester methyl mycocerosic milik MTB. Diagnosa *Mycocerosates* adalah asam trimethyl C₂₉ dan tetramethyl C₃₀ dan C₃₂. Seperti ditunjukkan Gambar 12, setiap mycocerosate digambarkan dengan karakteristik puncak ganda karena rasemisasi selama hidrolisis alkaline [18].

Analisa duplikasi dari ekstrak yang diperoleh dengan sampel dahak negatif yang dicemari biakan MTB (140-5600 CFU/ml) menunjukkan bahwa daerah puncak ester methyl asam mycocerosic memiliki hubungan yang linear dengan jumlah bakteri yang diuji [18].

Seperti terlihat pada Gambar 12, puncak C₂₉/C₃₀ dan C₃₂ sangat jelas terlihat dalam ekstrak setelah dicemari dengan 140 CFU/ml dan memiliki sinyal rata-rata terhadap noise ration (S/N) dari 36.2 untuk C₂₉/C₃₀ dan 55.3 untuk C₃₂ [18].

Setelah *unblinding*, kromatogram itu kembali dipelajari untuk mengevaluasi dimana kesalahan klasifikasinya. Negatif palsu teridentifikasi dengan cara mencari dimana *small characteristic doublet peaks* yang salah dalam *background* yang tinggi. Positif palsu teridentifikasi dimana yang bukan doublet, dua puncak *closely eluting* benar-benar telah diobservasi, yang dekat, waktu-waktu retensi yang diantisipasi, atau dimana doublet muncul tidak pada waktu retensi yang benar [18].



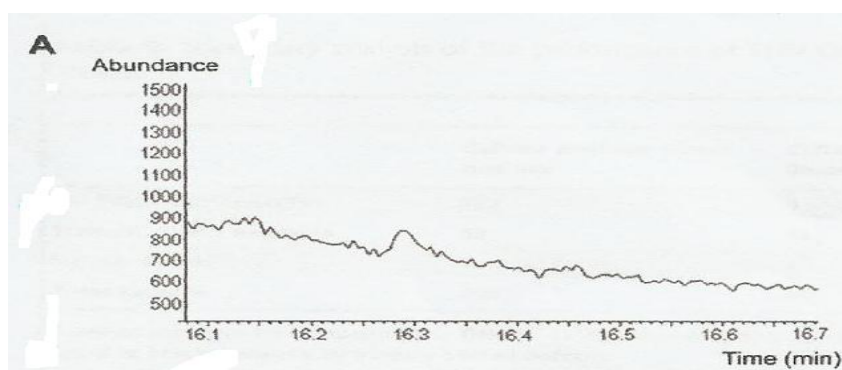
Gambar 12 Memperlihatkan ion-ion fragment m/z 101 dan m/z 88 selama ekstraksi 1 ml sampel dahak negatif TB yang dicemari dengan 140 CFU biakan MTB [18]

Hasil yang dinyatakan positif oleh kromatogram menunjukkan beberapa *feature* berikut:

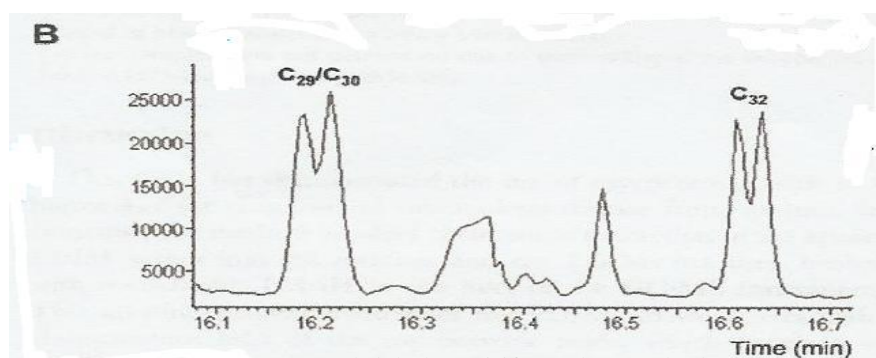
- (i) Kehadiran doublet yang berkarakter pada jejak m/z 101 dan m/z 88, pada waktu retensi C_{29}/C_{30} dan C_{32} ;
- (ii) Interval waktu antara dua doublet yang berkarakter dalam sampel dahak harus benar-benar cocok dengan yang dalam standar PDIM sehari-hari;
- (iii) Puncak doublet pada C_{29}/C_{30} sebanding dalam ukuran puncak doublet pada C_{32} , pada kromatogram ion m/z 101 dan m/z 88;
- (iv) Jejak m/z 101 dan m/z 88 sangat cocok satu sama lain dalam bentuk dan ukuran.

Hasil negatif dinyatakan untuk beberapa *feature* berikut:

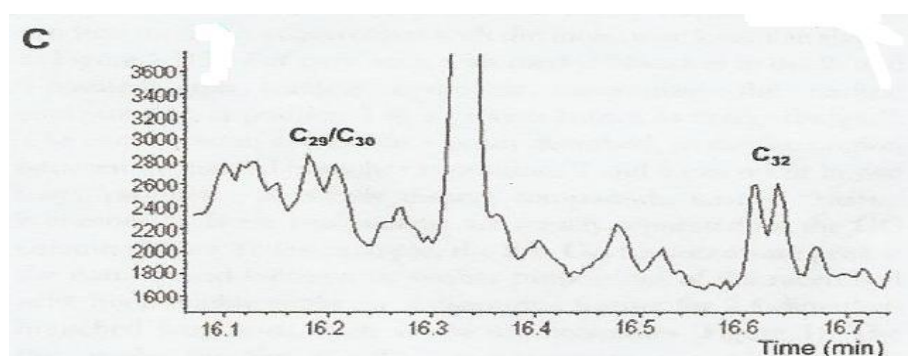
- (i) Ketidakhadiran salah satu atau kedua doublet berkarakter pada waktu retensi dalam kromatogram ion m/z 101 dan m/z 88;
- (ii) Adanya puncak tunggal pada salah satu dari waktu retensi dalam kromatogram ion m/z 101 dan m/z 88.
- (iii) Kehadiran dua *closely eluting*, namun berbeda puncak, bukan doublet, di salah satu waktu retensi yang diharapkan dalam kromatogram ion m/z 101 dan m/z 88;
- (iv) Interval waktu antara sinyal yang diduga C_{29}/C_{30} dan sinyal yang diduga C_{32} sangat tidak cocok dengan standar sehari-hari;
- (v) Ukuran doublet pada C_{29}/C_{30} dan pada C_{32} tidak sebanding;
- (vi) Bentuk dan ukuran kromatogram ion m/z 101 dan m/z 88 tidak cocok satu sama lain.



Gambar 13 (A). Kromatogram sampel dahak negatif TB [18]



Gambar 13 (B). Kromatogram sampel dahak positif TB dengan kadar PDIMs tinggi [18]



Gambar 13 (C). Kromatogram sampel dahak positif TB dengan kadar PDIMs rendah [18]

4. KESIMPULAN

Species *Mycobacteria tuberculosis* dalam nafas atau dahak pasien senantiasa tercampur dengan bakteri-bakteri species lain dalam genus *Mycobacterium* atau bahkan bakteri lain di luar genus tersebut, sehingga menghasilkan aroma yang kompleks, masalah ini adalah hal yang pokok untuk diatasi pada hampir semua prosedur identifikasi MTB, sehingga metode yang menggunakan biomarker tidak cukup hanya dengan mengandalkan kemampuan *electronic nose*.

Metode GC dirancang untuk memisahkan sampel (dahak) yang menguap menjadi komponen-komponen yang lebih kecil dan selanjutnya setiap/salah satu komponen diidentifikasi karakteristiknya. Adopsi terbaru dari sistem pemberian label untuk komposisi puncak pada cluster-cluster dan suatu puncak yang distandarisasi diharapkan mengatasi kebingungan karakterisasi banyak profil yang muncul dalam kromatogram, sehingga memungkinkan identifikasi ke tingkat species

Penting untuk diperhatikan dalam memilih *biomarker*, hindari *biomarker* yang sangat polar dan kurang stabil, jadi lebih baik menggunakan biomarker dalam bentuk *methyl/ester* seperti *Methyl Nicotinate* atau *Ester Methyl Mycocate* yang stabil, [16] dan [18] membuktikan dalam sampel nafas pasien positif TB yang dianalisis terbukti lebih banyak mengandung *biomarker* tersebut dibandingkan dengan nafas orang yang sehat.

Penggunaan GC masih memiliki kelemahan yaitu kebutuhan persiapan sampel yang kompleks sebelum analisis GC sebenarnya, maka diperlukan beberapa cara tambahan untuk mengurangi persiapan sampel yang kompleks yaitu dengan *solid phase micro extraction* (SPME), *hydrolysis and methylation* (THM) dan *thermochemolysis* (THM).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.Arend H.J. Kolk dari *Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT) Biomedical Research, Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam, Netherlands* yang mengirimkan beberapa jurnal penting untuk menjadi pustaka utama dalam paper ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Fend, R., Arend H. J. Kolk, Conrad Bessant, Patricia Buijtel, Paul R. Klatser, and Anthony C. Woodman, 2006, *Prospects for Clinical Application of Electronic-Nose Technology to Early Detection of Mycobacterium tuberculosis in Culture and Sputum*, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 44, No. 6, Hal. 2039-2045.
- [2] Gibson, T., Arend Kolk, Klaus Reither, Sjoukje Kuipers, Viv Hallam, Rob Chandler, Ritaban Dutta, Leonard Maboko, Jutta Jung and Paul Klatser, 2009, *Predictive Detection of Tuberculosis using Electronic Nose Technology*, Olfaction and Electronic Nose: Proceedings of the 13th International Symposium.
- [3] Kox, L.E.F., 1995, *Diagnostic of mycobacterial infection by nucleic acid amplification*, Respiration Medicine, Halaman 399, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [4] Phillips, M. Victoria Basa-Dalay, Graham Bothamley, Renee N. Cataneo, Phung Kim Lam, Maria Piedad R. Natividad, Peter Schmitt, and James Wai, 2010, *Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis*, Tuberculosis xxx, Hal. 1-7.
- [5] Kivihya-Ndugga, L., M. van Cleeff, E. Juma, J. Kimwomi, W. Githui, L. Oskam, A. Schuitema, D. van Soolingen, L. Nganga, D. Kibuga, J. Odhiambo, P. Klatser, 2004, *Utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis*, Journal of Clinical Microbiology, Hal. 1012, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [6] Hong, X. and A.J. Hopfinger, 2004, *Molecular modeling and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell wall permeability*, American Chemical Society, Vol. 5, Issue 3, Hal. 1066-1077.
- [7] Hong, X. and A.J. Hopfinger, 2004, *Construction, molecular modeling and simulation of Mycobacterium tuberculosis cell walls*, American Chemical Society.
- [8] Yao, Y., Barghava N., Kim J., Niederweis M., and Marassi FM, 2012, *Molecular structure and peptidoglycan recognition of Mycobacterium tuberculosis ArfA (Rv0899)*, Journal Molecular Biology.
- [9] Zhou, L., Xiaoxiao He, Dinggeng He, Kemin Wang, and Dilan Qin, 2011, *Biosensing Technologies for Mycobacterium tuberculosis Detetion: Status and New Development*, Clinical and Developmental Immunology, Article ID 193963, Hal. 1-8.
- [10] Stockman I., 1992, *DNA probes for the identification of mycobacteria*, Clinical microbiology procedures handbook, American Society for Microbiology in Tortoli, E. and Bartoloni A., 1996, *High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria*, Review In Medical Microbiology, Vol. 7, No 4, Hal. 207-219.
- [11] Kirschner, P., Meier A., Bottger EC., 1993, *Genotype identification and detection of mycobacteria: facing novel and uncultured pathogens*, In: Persing DH, Tenover F., White TJ., Smith TF., 1993, *Diagnostic molecular microbiology*, Washington, DC: American Society for Microbiology, In: Tortoli, E. and Bartoloni A., 1996, *High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria*, Review In Medical Microbiology, Vol. 7, No 4, Hal. 207-219.

- [12] Guerrant G.O., Lambert MA, Moss CW., 1981, *Gas-chromatographic analysis of mycolic acid cleavage products in mycobacteria*, Journal of Clinical Microbiology. Vol. 13, Hal. 899-907.
- [13] Jantzen E. Tangen T., and Eng J., 1989, *Gas chromatography of mycobacterial fatty acids and alcohols: diagnostic applications*, Acta Pathol Microbiol Immunol Scand, Vol. 97, Hal. 1037-1045.
- [14] Kaneda K., Naito S., and Imaizumi S., 1986, *Determination of molecular species composition of C₈₀ or longer-chain alpha-mycolic acid in Mycobacterium spp. By gas chromatography and mass spectrometry*, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 24, Hal. 1060-1070.
- [15] Tortoli, E. and Bartoloni A., 1996, *High-performance liquid chromatography and identification of mycobacteria*, Review In Medical Microbiology, Vol. 7, No 4, Hal. 207-219.
- [16] Syhre, M., Laurens Manning, Suparat Phuanungkoonnon, Paul Harino, and Stephen T. Chambers, 2009, *The scent of Mycobacterium tuberculosis – Part II breath*, Tuberculosis 89, Hal. 263-268.
- [17] Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [18] O’Sullivan, D.M., Simona C. Nicoara, Reggie Mutetwa, Stanley Mungofa, Oona Y-C. Lee, David E. Minnikin, Max W. Bardwell, Elizabeth L. Corbett, Ruth McNerney, and Geraint H. Morgan, 2012, *Detection of Mycobacterium tuberculosis in Sputum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Methyl Mycocerosates Released by Thermochemolysis*, PloS ONE, Vol. 7, Issue 3.
- [19] Ghasemi-Varnamkhasti. M., Seyed Saeid Mohtasebi, Maryam Siadat, and Sundar Balasubramanian, 2009, *Meat Quality Assessment by Electronic Nose (Machine Olfaction Technology)*, Sensor, 9, Hal. 6058-6083.
- [20] Kolk, A., Michael Hoelscher, Leonard Maboko, Jutta Jung, Sjoukje Kuiper, Michael Cauchi, Conrad Bessant, Stella van Beers, Ritaban Dutta, Tim Gibson, and Klaus Reither, 2010, *Electronic-Nose Technology Using Sputum Samples in Diagnosis of Patients with Tuberculosis*, Journal of Clinical Microbiology, Vol. 48, No. 11, Hal. 4235-4238.
- [21] Rivai, M., Djoko Purwanto, Hendro Juwono, and Hari Agus Sujono, 2011, *Electronic Nose using Gas Chromatography Column and Quartz Crystal Microbalance*, Telkomnika, Vol. 9, No. 2, Hal. 319-326.
- [22] Shalahuddin, I., 2004, *Kromatografi Gas*, www.wordpress.com, diakses tgl 19 April 2012.
- [23] Syhre, M. and Stephen T. Chambers, 2008, *The scent of Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, 88, Hal. 317-323.
- [24] Estrada, R. and Patino H., 1962, *Nicotinic acid biosynthesis by Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Bacterial, Vol. 84, Hal. 871-873.
- [25] Albertson, J.N. and Moat A.G., 1964, *Biosynthesis of nicotinic acid by Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Bacterial, Vol. 89, Hal. 540-541.
- [26] El Ridi, M.S., 1953, *Role of tubercle bacilli in raising the nicotinic acid level in the blood*, Journal of Egypt Madicine Association, Vol. 36, Hal. 435-444.

- [27] Toriyama, S., I. Yano, M. Masui, E. Kusunose, M. Kusunose, 1978, *Separation of C50--60 and C70--80 Mycolic acid molecular species and their changes by growth temperatures in Mycobacterium phlei*, FEBS lett, Nov 1; 95(1): 111-115.
- [28] Stopforth, A., A.Tredoux, A.Crouch, P. van Helden, P. Sandra, 2005, *A Rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive extraction-thermal desorption gas*, Journal of Chromatography, Halaman 135, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [29] Cha, D., D.Cheng, M. Liu, Z. Zeng, X. Hu, W. Guan, *Analysis of fatty in sputum from patients with pulmonary tuberculosis using gas chromatography-mass spectrometry preceded by solid-phase microextraction*, 2009, Journal of Chromatography, Halaman 1450, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [30] David F., B. Tiepont, and P. Sandra, 2008, *Chemotaxonomy of bacteria by comprehensive GC and GC-MS in election impact and chemical ionisation mode*, Journal Sep, Sci., Halaman 3395, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [31] de Koning J.A., P. Blokker, P. Jungel, G. Alkema, U.A.Th. Brinkman, 2002, *Automated linear exchange-A novel approach in direct thermal desorption-gas chromatography*, Journal of Chromatography, Halaman 185, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [32] Akoto L., F. Stellard, H. Irth, R.J.J. Vreuls, R. Pel, 2008, *Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography, Hal. 365, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.
- [33] Mayakova, T.I., E.E. Kuznetsova, M.G. Kovaleva, and S.A. Plyusnin, 1995, *Gas chromatographic-mass spectrometry study of lipids and rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis*, Journal of Chromatography, Hal. 133, In: Kaal, E., Arend H.J. Kolk, Sjoukje Kuiper, and Hans-Gerd Janssen, 2009, *A fast method for the identification of Mycobacterium tuberculosis in sputum and cultures based on thermally assisted hydrolysis and methylation followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1216, Hal. 6319-6325.